ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA
VOL. VI, 2. SECTIO D 1951

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie.
Kierownik: Prof. dr Janina Opieńska-Blauth.

Janina OPIEŃSKA-BLAUTH, Eugeniusz DROZDOWSKI
i Marek KAŃSKI

Chromatografia bibułowa i jej zastosowanie do analizy cukrowców

Бумажная хроматография и ее применение к анализам углеводов

Paper partition Chromatography and its Application to Carbohydrates Analysis

Celem niniejszej pracy było ustalenie podstaw metodycznych zastosowania chromatografii rozdzielczej na bibule do analizy niektórych cukrowców, które interesowały nas (Opieńska-Blauth, Kański, Stobińska 16), w związku z prowadzonymi badaniami nad przemianą węglowodanową u Escherichia coli.

Metodyka chromatografii bibułowej znalazła szerokie zastososowanie w Związku Radzieckim i innych krajach, jako szczególnie cenne uzupełnienie dotychczas stosowanych metod, zwłaszcza w dziedzinie biochemii i chemii organicznej. U nas, w kraju, do tej pory mało uwagi poświęca się chromatografii bibułowej, przeto pracę tę — pierwszą z cyklu prac wykonanych tą metodą — poprzedzamy szerszym wstępem.

Wstęp

Do najwcześniejszych prac, w których posługiwano się bibułą filtracyjną w analizie przypominającej analizę chromatograficzną, zalicza W. W. Raczinskij (19) prace Cohna z 1851 r., który rozróżniał niektóre barwniki po wkropleniu ich na bibułę na podstawie rozchodzenia się tworzących się barwnych pierścieni, oraz Rungego z 1855 r., który zauważył periodyczność procesów zachodzących przy przechodzeniu roztworu soli i ługów przez bibułę filtracyjną nasyconą uprzed-

nio różnymi solami. Z dalszych usiłowań tego typu należy wymienić „analizę kapilarną“ Schönbeina i Goppelsrödera (20, 9). Wspomniane prace nie miały jednak większego praktycznego znaczenia i nie miały, w istocie, wiele wspólnego z właściwą chromatografią.

Twórcą chromatografii był M. S. Cwiet, utalentowany botanik rosyjski, który opublikował w Warszawie w 1903 r. swoją podstawową pracę kładąc w ten sposób podwaliny pod nową gałąź analityki chemicznej. W swych klasycznych doświadczeniach rozdzielił on barwniki zielonych liści w kolumnie adsorpcyjnej wypełnionej węglanem wapniowym (3). Jakkolwiek prace M. S. Cwieta poświęcone były głównie chromatografii adsorpcyjnej, kolumnowej, to jednak przypisywał on duże znaczenie wykorzystaniu bibuły filtracyjnej do celów analizy chromatograficznej i wskazywał na to, że przy użyciu bibuły można będzie osiągnąć lepsze rozdzielenie składników niektórych mieszanin (cyt. za Rzaczinskim).

Chromatografia adsorpcyjna początkowo nie wzbudziła większych zainteresowań w świecie naukowym, ale w ciągu ostatnich 20 lat rozpowszechniła się szeroko i stała się jedną z podstawowych metod w analizie jakościowej oraz preparatyce chemicznej. W zakresie biochemii ten szybki rozwój chromatografii adsorpcyjnej datuje się od Kuhna (13) i współpracowników nad rozdzielaniem barwników karotenoidowych.

W 1920 r. uczony radziecki N. A. Tananajew (22) opisał metodę analityczną służącą do identyfikowania związków chemicznych na bibule filtracyjnej, którą nazwał metodą kroplową. Metoda ta była bardzo podobna do pewnych odmian dziś stosowanych metod chromatografii rozdzielczej na bibule. Ogromny materiał doświadczalny zawarty w pracy Tananajewa nie został należycie wykorzystany, głównie ze względu na trudności natury teoretycznej — brak było w tym czasie ujęcia spostrzeganych zjawisk w ugruntowaną pod względem fizyko-chemicznym teorię. Dziś wiemy, że to, co otrzymywał Tananajew na bibule ,było chromatogramami mieszanego typu.

Zagadnienia teorii chromatografii adsorpcyjnej, a co za tym idzie, i chromatografii rozdzielczej zostały należycie oświetlone w szeregu prac uczonych radzieckich oraz innych.

Ponieważ w chromatograficznym rozdzielaniu składników mieszaniny biorą główny udział przede wszystkim dwa czynniki: różna zdolność adsorpcyjna składników mieszaniny i różny stopień rozpu-

szczalności, który wpływa na rozdzielenie się związku między dwa płyny lub powoduje wypadanie osadu, przeto słusznym było oparcie podziału metod chromatograficznych na:

chromatografię adsorpcyjną (wprowadzoną przez Cwieta),

chromatografię osadową (wprowadzoną przez E. N. i T. B. Gaponów (8)),

chromatografię rozdzielczą (wprowadzoną przez Martina i Synge'a (15)).

Zasadnicza różnica pomiędzy chromatografią adsorpcyjną i rozdzielczą polega na tym, że gdy w pierwszej podstawowym zjawiskiem jest ustalenie się równowagi między fazą płynną i ciałem stałym, to w chromatografii rozdzielczej równowaga ta ustala się pomiędzy dwiema fazami płynnymi, z których jedna „unieruchomiona" jest na porowatej „podporze" w postaci żelu lub bibuły.

Rozdzielanie składników mieszaniny pomiędzy dwa nie mieszające się ze sobą rozpuszczalniki (np. chloroform i wodę) opiera się na istnieniu charakterystycznego dla każdego związku współczynnika podziału.

Podkreślić trzeba, że istnieje metoda, która nie posługuje się żadną „mechaniczną podporą" dla uzyskania całkowitego rozdzielenia mieszaniny, lecz w której stosuje się ciągłą ekstrakcję w specjalnym przyrządzie i przy pomocy specjalnie dobranych rozpuszczalników — jest to metoda opisana przez Craiga (2). Istnieją poglądy, że nazwa „chromatografia" obejmująca różnorodne techniki analityczne staje się dziś już zbyt wąskim pojęciem, gdyż coraz częściej wchodzi w użycie zastosowywanie innych testów niż barwne. Dla przykładu można wymienić „analizę frontalną" Tiseliusa, przy pomocy której identyfikuje się składniki mieszaniny na podstawie współczynnika załamania promienia świetlnego przechodzącego przez poszczególne frakcje roztworu poddawanego rozdzielaniu chromatograficznemu. Innym sposobem jest mierzenie przewodnictwa elektrycznego tych frakcji. Wymienione tu przykłady odnoszą się do chromatografii adsorpcyjnej kolumnowej, ale ostatnio również w chromatografii rozdzielczej na bibule wprowadza się podobne metody. Wystarczy wskazać na tzw. „radiochromatogramy", z których korzysta się przy rozdzielaniu substancji piętnowanych izotopami radioaktywnymi i gdzie miejsca zatrzymania się tych substancji na bibule wykazuje błona światłoczuła przyłożona do bibuły.

Należy podkreślić, że chromatografia rozdzielcza na bibule często musi być uzupełniana lub poprzedzana wstępną chromatografią adsorpcyjną (najczęściej na żelu krzemianowym lub syntetycznych żywicach jonowymiennych). Tak więc chromatografia bibułowa łączy się z chromatografią adsorpcyjną kolumnową nie tylko pod względem wspólnych aspektów teoretycznych, lecz również ze względów ściśle praktycznych.

Ważnym etapem w rozwoju chromatografii bibułowej okazały się prace Consdena, Gordona i Martina (1) przeprowadzone w 1944 roku. Autorzy ci, w miejsce kolumny, użyli paska bibuły filtracyjnej jako mechanicznej podpory dla fazy wodnej układu rozpuszczalników, oraz zastosowali rozpuszczalnik organiczny jako fazę niewodną, która spływa po pasku bibuły powodując rozdzielanie się składników mieszaniny wskutek tego, że posiadają one różne współczynniki podziału pomiędzy dwa mieszające się ze sobą rozpuszczalniki. Doskonałe rezultaty osiągnięte przy pomocy tej metody przy rozdzielaniu aminokwasów w hydrolizatach białek zachęciły licznych badaczy do zastosowania chromatografii rozdzielczej bibułowej do rozdzielania i wykrywania innych typów związków chemicznych, jak np.: węglowodanów, zasad purynowych, związków nieorganicznych, kwasów organicznych i wielu innych.

Teoretyczna strona chromatografii rozdzielczej pomimo licznych prac naświetlających dość wszechstronnie to zagadnienie, o czym wspomniano wyżej, nie jest sprawą ostatecznie zamkniętą.

Przechodzenie składników rozpuszczonych z jednej fazy do drugiej fazy układu rozpuszczalników tłumaczy się różnicami sił działających na daną cząsteczkę w obu tych fazach. Jeżeli np. grupa CH_2 przechodzi z wody do cykloheksanu, to dzieje się tak dlatego, że grupa CH_2 w cykloheksanie rozdziela cząsteczki rozpuszczalnika, które powiązane są między sobą tylko siłami van der Waalsa, podczas gdy w wodzie cząsteczki powiązane są o wiele silniejszymi wiązaniami wodorowymi. CH_2 jest zatem jakby wypierane z wody do cykloheksanu. Współczynnik podziału dla grupy CH_2 uprzywilejowuje w tych warunkach cykloheksan. Z tych samych względów, z jakich współczynnik podziału związków alifatycznych kształtuje się korzystnie dla cykloheksanu, benzen uprzywilejowuje związki aromatyczne. Fenol lub kollidyna, nasycone wodą, stanowią doskonałe rozpuszczalniki dla ciał zdolnych do tworzenia wiązań wodorowych. Ich specyficzne dzia-

łanie wzmaga fakt, że fenol jest donatorem wodoru, gdy kollidyna jest akceptorem wodoru.

Dodatkowym czynnikiem wzmagającym prawdopodobieństwo rozdziału dwóch związków na drodze chromatograficznej jest zmiana stopnia asocjacji cząsteczek tych związków w zależności od rodzaju rozpuszczalnika.

Zagadnienie, w jakim stopniu w chromatografii rozdzielczej bierze udział adsorpcja, a w jakim wyłącznie tylko współczynnik podziału, to sprawa niezupełnie jeszcze rozstrzygnięta. Wydaje się jednak, że adsorpcja odgrywa tu jedynie podrzędną rolę.

Chromatografia rozdzielcza może być przykładem stosowania tzw. przeciwprądowej ekstrakcji do oczyszczania i rozdzielania mieszanin związków. Proces ten musi opierać się na wytwarzaniu wielokrotnych stopni równowagi. Czas potrzebny dla przejścia mieszaniny przez szereg stopni równowagi (które można wyobrazić sobie teoretycznie pod postacią płytek lub warstewek), musi być stosunkowo krótki, jeżeli zależy na osiągnięciu praktycznie dużej wydajności. Takie szybkie wytwarzanie równowagi można uzyskać wyłącznie przez zmniejszenie do minimum odległości, jaką przebyć mają dyfundujące cząsteczki, oraz przez zwiększenie do maksimum powierzchni pomiędzy fazami.

W fazach ciekłych odległość pomiędzy dyfundującymi cząsteczkami można zmniejszyć przez wstrząsanie. W obecności faz stałych, lub ciekłych unieruchomionych na stałej podporze, należy dążyć do posługiwania się bardzo drobnymi cząstkami, względnie dążyć trzeba do wytworzenia możliwie cienkich warstewek. W chromatografii rozdzielczej użycie takich drobnych cząstek nie napotyka na żadne trudności.

Są adsorbenty, w których ustalanie się równowagi jest bardzo powolne, nawet w stanie dużego rozdrobnienia. Np. przy węglu aktywnym ustalanie się równowagi jest bardzo powolne na skutek znacznej energii aktywnej, hamującej przechodzenie z jednej fazy do drugiej. Rozpatrując stosunki między obiema fazami w chwili ustalania się równowagi należy przyjąć dla uproszczenia, że ciecze te podlegają prawu Raoulta, czyli że należą do roztworów „idealnych".

Niżej podane rozważania zaczerpnięto z artykułu A. J. R. Martina, opublikowanego w Biochemical Society Symposia z 1949 r. (15).

Dla roztworów „idealnych" otrzymuje się:

$$\mu_A^S = \mu_A^{S_0} + RT \ln N_A^S$$

gdzie μ_A^S oznacza potencjał chemiczny substancji A,

$\mu_A^{S_0}$ oznacza potencjał chemiczny w pewnym określonym stanie początkowym,

N_A^S oznacza, jaka część mola ciała A znajduje się w fazie S.

Jeżeli obie fazy S i M są w równowadze, to potencjał chemiczny wszystkich składników jest jednakowy. A zatem

$$\mu_A^M = \mu_A^S = O = \mu_A^{M_0} - \mu_A^{S_0} + RT \ln N_A^M - RT \ln N_A^S$$

$$\text{lub jeżeli } \mu_A^{S_0} - \mu_A^{M_0} = \Delta \mu_A$$

$$\Delta \mu_A = RT \ln \left(\frac{N_A^M}{N_A^S} \right)$$

N_A^M / N_A^S jest współczynnikiem podziału (wyrażonym w ułamku molarnym) i oznacza się go symbolem α; stąd więc

$$\ln \alpha = \frac{\Delta \mu A}{RT}$$

gdzie $\Delta\mu_A$ równa się wolnej energii potrzebnej do przesunięcia jednego mola związku A z fazy S do fazy M. Przyjmijmy teraz, że

$\Delta \mu_A$ składa się z $d\, \Delta \mu_{CH_2} + e\, \Delta \mu_{COO} - + f\, \Delta \mu_{NH_3} + + g\, \Delta \mu_{OH} + \ldots$

czyli, że stanowi sumę różnic potencjałów rozmaitych grup, z których złożona jest cząsteczka A.

Oznacza to na pierwszy rzut oka, że wolna energia potrzebna do przeniesienia danej grupy (np. CH_2) z jednego rozpuszczalnika do drugiego jest niezależna od reszty cząsteczki. Można, wobec tego, przewidywać, że wszystkie izomerony zawierające te same grupy (o ile stopień ich jonizacji nie ulegnie zmianie, podobnie jak i same właściwości) będą posiadały ten sam współczynnik podziału.

Jeżeli rozpatrywać współczynniki podziału α_A i α_B dwóch ciał A i B, które różnią się tym od siebie, że B posiada dodatkowo grupę X, to:

$$\ln \alpha_A = \frac{\Delta \mu A}{RT}, \ln \alpha_B = \frac{\Delta \mu B}{RT} + \frac{\Delta \mu X}{RT}, \ln \left(\frac{\alpha B}{\alpha A}\right) = \frac{\Delta \mu X}{RT}$$

Widać stąd, że dodanie grupy X zmienia współczynnik podziału o pewną wielkość zależną od natury tej grupy i od obu faz rozpuszczalników, ale niezależny od pozostałej reszty cząsteczki. Stwierdzenie to przeczy zwykłym przewidywaniom, według których utworzenie pochodnej znacznie powiększającej ciężar cząsteczkowy powinno zniwelować wszelkie istniejące różnice i w ten sposób udaremnić rozdzielenie. W rzeczywistości praktyka, zgodnie z wyprowadzonym równaniem, przeczy takim przypuszczeniom.

Zastosujmy to rozumowanie do aminokwasów i peptydów.

Przy tworzeniu się cząsteczki dwupeptydu z dwóch cząsteczek aminokwasów, lub przy tworzeniu trójpeptydu z cząsteczki aminokwasu i dwupeptydu powstaje grupa — CONH — a znika jedna grupa COO^-, oraz jedna grupa NH_3^+.

Załóżmy zatem istnienie aminokwasów $A^{NH_3+}_{COO^-}$ i $B^{NH_3+}_{COO^-}$ oraz peptydu $NH_3^+ \cdot A \cdot CO \cdot NH \cdot B \cdot COO^-$ i odpowiednich współczynników podziału α_A, α_B i α_{AB}.

$$RT \ln \alpha_A = \Delta \mu_{NH_3+} + \Delta \mu_A + \Delta \mu_{CCO^-},$$

$$RT \ln \alpha_A = \Delta \mu_{NH_3+} + \Delta \mu_B + \Delta \mu_{COO^-},$$

$$RT \ln \alpha_{AB} = \Delta \mu_{NH_3+} + \Delta \mu_A + \Delta \mu_{CONH} + \Delta \mu_B + \Delta \mu_{COO^-},$$

$$RT \ln \left(\frac{\alpha A \ \alpha A}{\alpha AB}\right) = \Delta \mu_{NH_3+} + \Delta \mu_{COO^-} - \Delta \mu_{CONH}$$

Oznacza to, że iloczyn współczynników podziału składanych aminokwasów podzielony przez współczynnik podziału dwupeptydu jest stały dla danego układu faz. To samo dotyczy izomeronów.

Płynie stąd dalszy wniosek, że potencjał dużej cząsteczki jest odpowiednio duży. Wynika stąd, że różnice w przesuwaniu się cząsteczki z jednego rozpuszczalnika do drugiego muszą być bardzo czułe na zmiany w rozpuszczalniku. Nie znaczy to jednak, że łatwo jest rozdzielić duże cząsteczki niewiele różniące się między sobą np. za pomocą wysalania, gdzie już małe zmiany w składzie lub stężeniu rozpuszczalnika wystarczają do powstawania strątu, ale oznacza to, że tam, gdzie stosuje się z powodzeniem takie rozdzielenie, tam dobry wynik spowodowany jest znacznymi różnicami w cząsteczkach.

Uzyskanie dobrego rozdziału jednego ciała w stosunku do drugiego w czasie przesuwania się z jednej fazy do drugiej opiera się na dużej różnicy w zmianach potencjału chemicznego tych dwóch ciał. Jeżeli cząsteczki tych ciał są bardzo podobne do siebie, to różnice takie występują tylko wtedy, kiedy dwie fazy różnią się swym składem. Ogólnie zatem powinno się dobierać takie fazy, które są możliwie najbardziej odległe od składu krytycznego roztworu. Nierozpuszczalność substancji badanych albo zbyt duże albo zbyt małe wartości współczynników podziału zwykle znacznie ograniczają ten warunek.

Zanim przystąpimy do opisywania technicznej strony chromatografii rozdzielczej na bibule, podamy kilka powszechnie przyjętych symboli.

A = powierzchni przekroju paska bibuły wraz z fazą wodną i fazą rozpuszczalnika.

A_L = powierzchni przekroju fazy rozpuszczalnika (fazy niewodnej, fazy ruchomej).

A_S = powierzchni przeproju fazy wodnej

α = współczynnik podziału $= \dfrac{\text{stężenie molarne w fazie wodnej}}{\text{stężenie molarne w fazie niewodnej}}$

$$R = \frac{A}{A_L + \alpha A_S}$$

Dla uproszczenia wprowadzono nowy symbol R_F równoważny R.

$$R_F = \frac{\text{przesunięcie badanej substancji}}{\text{przesunięcie frontu rozpuszczalnika}} = \frac{R\,A_L}{A} = \frac{A_L}{A_L + \alpha A_S}$$

albo $= \frac{A_L}{R_F\ A_S} - \frac{A_L}{A_S} = \frac{A_L}{A_S}\left(\frac{1}{R_F} - 1\right)$

$\frac{A_L}{A_S}$ wyraża stosunek fazy rozpuszczalnika i fazy wodnej na chromatogramie.

(Przez przesunięcie badanej substancji rozumie się odległość, o którą przesunęła się badana substancja na pasku bibuły od miejsca wkroplenia do miejsca zatrzymania się tej substancji. Przesunięcie przeto rozpuszczalnika jest to odległość, o jaką przesunął się front fazy ruchomej od miejsca wkroplenia do miejsca zatrzymania frontu rozpuszczalnika w chwili ustania spływu fazy ruchomej).

Podstawową cechą chromatografii jest posługiwanie się, obok fazy niewodnej, fazą stacjonarną, nieruchomą, która musi być ciałem stałym, hydrofilnym, nasyconym pewną ilością wody. Nie ulega wątpliwości, że woda imbibowana przez celulozę różni się zasadniczo od wody w zwykłym tego słowa znaczeniu i wydaje się, że traktowanie fazy nieruchomej, jako fazy wodnej, jest zbytnim uproszczeniem zagadnienia. Imbibowana woda istnieje zapewne w stanie daleko posuniętej organizacji strukturalnej (np. w postaci łańcuchów cząsteczek wody powiązanych ze sobą i powiązanych z grupami wodorotlenowymi celulozy przy pomocy mostków wodorowych) i dlatego słuszniej byłoby może mówić o kompleksie celulozo-wodnym. Zawartość wody w celulozie może być różna — zależy to w dużej mierze od charakteru rozpuszczalnika stanowiącego fazę ruchomą układu.

Niektórzy autorzy wypowiadają hipotezę, że cząsteczki ciała badanego, ze względu na swoje hydrofilne własności, są zdolne wraz z cząsteczkami wody do przyłączenia się do labilnego, ale zorganizowanego kompleksu celulozo-wodnego. Mogłoby to polegać na łączeniu grup hydrofilnych ciała rozpuszczonego z cząsteczkami wody już związanymi w tym kompleksie, a także na sporadycznym łączeniu się cząsteczek ciała rozpuszczonego wprost z grupami wodorotlenowymi celulozy.

Jak już wspomniano uprzednio, chromatografię rozdzielczą na bibule zastosowano po raz pierwszy w stosunku do aminokwasów, jako produktów hydrolizy białek. Była to początkowo metoda wyłącznie jakościowa, ale w ostatnich latach mnożą się liczne próby użycia chromatografii bibułowej dla celów analizy ilościowej. W przypadku węglowodanów redukujących proponuje się oznaczać je ilościowo na pod-

stawie rozmiarów i natężenia barwy wywołanych plam lub przez eluowanie rozdzielonych już cukrowców z pasków bibuły i oznaczanie ich stężenia w eluatach przy pomocy mikromed.

Ze względu na konieczność ograniczania ram niniejszej pracy odsyła się czytelników interesujących się rozwojem historycznym i możliwościami zastosowania chromatografii bibułowej w rozmaitych dziedzinach chemii do kilku monografii, jakie się dotychczas ukazały (19), (17), (18), (4).

Chromatografia bibułowa rozdzielcza jest metodą analityczną, która powstała przed sześciu laty i znajduje się obecnie w okresie pełnego rozwoju. Większość prac opublikowanych do chwili obecnej zajmuje się stroną metodyczną, jednakże istnieje już dostatecznie duża liczba prac doświadczalnych świadczących o możliwości ogromnej ekspansji tej metody na teren chemii, a zwłaszcza biochemii.

Głównymi zaletami chromatografii rozdzielczej na bibule są: małe ilości roztworów potrzebne do przeprowadzenia analizy, możliwości przeprowadzania badań w obecności wielu ciał towarzyszących, znaczna selektywność i specyficzność metody (zdolność wykrywania szeregu pokrewnych związków obok siebie), możliwość stosowania do wywoływania chromatogramów odczynników grupowych lub takich niespecyficznych środków jak promienie ultrafioletowe, w końcu prosta stosunkowo aparatura i łatwość opanowania techniki.

Do cech ujemnych chromatografii bibułowej należą: długotrwałość przeprowadzanego doświadczenia, konieczność posiadania czystych wzorcowych preparatów chemicznych dla przeprowadzania porównawczych oznaczeń, dość znaczne zużycie rozpuszczalników organicznych oraz odczynników wywołujących, konieczność usuwania soli nieorganicznych przy badaniu większości związków organicznych i konieczność stosowania pewnych środków ostrożności zabezpieczających osoby dokonywujące badań przed szkodliwym działaniem par rozpuszczalników organicznych. Niekiedy może nastręczać trudności zaopatrzenie się w odpowiednią bibułę filtracyjną, ponieważ do chromatografii nadają się tylko niektóre wysoko gatunkowe bibuły.

Jakkolwiek technika chromatografii rozdzielczej na bibule ulegała licznym modyfikacjom, to w zasadzie aparatura do chromatografii bibułowej składa się z następujących części:

1. kamera chromatograficzna — cylinder szklany odpowiednich rozmiarów, szczelna oszklona szafka drewniana lub metalowa, termostat itp.,
2. rynienka szklana — rura szklana zatopiona z dwóch końców i posiadająca szczelinę wyciętą wzdłuż rury,
3. płytka szklana — odpowiedniej grubości służąca do utrzymywania paska bibuły w rynience (płytka ta wciśnięta do szczeliny wyciętej w rynience nie powinna zbyt mocno przyciskać wsuniętego do rynienki paska bibuły),
4. bagietka szklana — umieszczona tuż obok rynienki, równoległe do niej podtrzymuje swobodnie zwieszający się pasek bibuły,
5. bibuła chromatograficzna — zwykle bibuła filtracyjna Whatmana Nr 1 lub Nr 4, albo bibuła Schleicher—Schüll Nr 597,
6. rozpylacz szklany lub wanienka do wywolywania chromatogramów,
7. suszarka do suszenia chromatogramów.

Część doświadczalna

Celem naszej pracy było ustalenie wpływu warunków doświadczalnych na wartość współczynnika R_F, porównanie osiągniętych wyników z wynikami innych autorów, a przede wszystkim opracowanie warunków rozdzielania dwucukrowców redukujących od niektórych cukrowców prostych. Ostatnie zadanie wiązało się bezpośrednio z zamierzonymi badaniami chromatograficznymi nad przemianą węglowodanową w płynnych hodowlach Escherichia coli.

W naszych doświadczeniach posługiwaliśmy się w zasadzie klasyczną metodą z uwzględnieniem modyfikacji podanych przez autorów zajmujących się szczególnie chromatografią węglowodanów, jakkolwiek pod wielu względami technika nasza odbiegała od opisywanych w literaturze wzorów.

Doświadczenia przeprowadzaliśmy na chemicznie czystych preparatach glukozy, galaktozy, fruktozy, mannozy, arabinozy, ksylozy, laktozy, maltozy, sacharozy, rafinozy, glukozaminy i kwasu glukuronowego.

Badaliśmy kolejno wpływ rozmaitych czynników zmiennych na kształtowanie się chromatogramów oraz na wartości R_F badanych cukrowców.

Do czynników tych należały: różne kamery chromatograficzne, rodzaj bibuły, czas spływu fazy ruchomej rozpuszczalnika, różny skład rozpuszczalników użytych w układzie, wpływ stężenia badanych roztworów, wpływ towarzyszących soli i wpływ stężenia jonów wodorowych, oraz dobór odpowiedniego odczynnika wywołującego i techniki wywoływania chromatogramów.

Metodyka

Jako kamery służyły nam początkowo sloje, jakie zwykle bywają używane jako zbiorniki przy umywalniach pedałowych przenośnych. Wewnątrz sloja, w górnej, rozszerzonej jego części umieszczaliśmy naczyńko szklane prostopadłościenne, które zastępowało nam rynienkę szklaną. Na dnie słoja ustawialiśmy płytkę Petriego napełnioną fazą wodną układu rozpuszczalników. Ten typ kamery oznaczamy w naszych doświadczeniach Nr II dla odróżnienia od kamery Nr I — termostatu o powszechnie używanych wymiarach. Do wkraplania badanych roztworów na bibułę zastosowaliśmy mikropipetkę tak wyciągniętą z grubościennej rurki szklanej, by objętość jednej kropli wynosiła 6 mikrolitrów. Roztwory badanych cukrowców wkraplano zawsze przy tym samym wypełnieniu mikropipetki, przy tym samym kącie nachylenia w stosunku do powierzchni bibuły i z tej samej wysokości. Tak wypuszczane krople rozlewały się i zwilżały bibułę w kręgi o średnicy około 1 cm.

Stale powtarzające się różnice w wartości R_F uzyskiwanych w kamerze II (słój szklany jest najbardziej rozpowszechnionym typem kamery wśród klasyków chromatografii rozdzielczej na bibule) i w kamerze I (termostat), między którymi zasadnicza różnica streszczała się w pojemności kamery, zmusiły nas do zainteresowania się budową samej kamery i stabilizacją warunków doświadczalnych w samej kamerze (p. tab. I).

W pierwszych próbach przeprowadziliśmy doświadczenia na posiadanej przez nas bibule krajowej, ale zamiast ostro odgraniczających się plam otrzymywaliśmy tylko nieregularne smugi rozlewające się szeroko po całym pasku bibuły. Wobec tych wyników zaczęliśmy poszukiwać bibuły, któraby posiadała doskonałą jednolitość (bez miejsc o mniejszym lub większym zagęszczeniu włókien oraz bez wytłaczanych wzorów), dość znaczną gęstość przy niewielkiej grubości i jak najmniej zanieczyszczeń związkami nieorganicznymi. Z posia-

danych bibuł tego typu dobre rezultaty osiągaliśmy przy użyciu bibuły Angel Reeve Nr 201 w krążkach średnicy 11 cm. Niestety, paski wycinane z tych krążków okazały się zbyt krótkie dla uzyskania dostatecznego rozdzielenia szeregu cukrowców. Wówczas, wzorując się na danych z literatury radzieckiej, zaopatrzyliśmy się w bibułę Whatmana Nr 1 w arkuszach i na tej bibule prowadziliśmy nasze dalsze doświadczenia osiągając stale dobre wyniki.

Po wkropleniu badanych roztworów na „linię startową" paska bibuły (biegnącą w odległości ok. 5 cm od jednego z krótszych brzegów paska) i po wysuszeniu powstałych wilgotnych plam w temperaturze pokojowej, lub przy pomocy suszarki fryzjerskiej (tzw. Fön), zakładaliśmy pasek bibuły do rynienki chromatograficznej zaginając jego brzeg powyżej miejsca wkroplenia, bibułę w rynience umocowywaliśmy przy pomocy płytki szklanej odpowiednio dopasowanej do szerokości szczeliny rynienki, do rynienki wprowadzaliśmy fazę niewodną układu rozpuszczalników i kamerę szczelnie zamykaliśmy.

Szklane ściany kamery umożliwiały obserwowanie postępu spływu fazy ruchomej, niewodnej, po pasku bibuły, który, przewieszony przez pałeczkę szklaną umieszczoną na wysokości górnego brzegu szczeliny rynienki i równolegle do niej, zwisał pionowo ku dołowi. Z chwilą, gdy front fazy ruchomej osiągał odległość kilku cm od dolnego brzegu paska bibuły przerywaliśmy spływanie wyjmując chromatogram z kamery.

Suszenie pasków bibuły przeprowadzaliśmy w suszarce, w temperaturze 105°C, w czasie 10 do 15 minut.

Po wysuszeniu chromatogramów wywoływaliśmy plamy cukrowców redukujących jednym z następujących odczynników: amoniakalnym roztworem azotanu srebrowego (odczynnik Tollensa), odczynnikiem Fehlinga, odczynnikem Benedicta, odczynniikem Rubnera, benzydynowym odczynnikiem Taubera i kwasem pikrynowym. Najbardziej zadowalające rezultaty osiągaliśmy z odczynnikiem Tollensa i kwasem pikrynowym.

Ponieważ chromatogramy wywoływane odczynnikiem Tollensa dość szybko ciemnieją, stosowaliśmy początkowo przemywanie chromatogramów w bieżącej wodzie w ciągu 20 do 30 min. i wysuszanie w suszarce. W dalszym ciągu doświadczeń opracowaliśmy inną technikę utrwalania chromatogramów, która pozwoliła nie tylko na skrócenie procedury, lecz również na uzyskanie plam silnie kontrastujących

z jasnym tłem bibuły. Po wywołaniu przemywaliśmy paski bibuły w 0,02 M roztworze wodnym tiosiarczanu sodowego i krótko w bieżącej wodzie, po czym suszyliśmy je w suszarce, albo — częściej jeszcze — w temperaturze pokojowej

Technika wywoływania plam, jaką stale stosowaliśmy, różniła się również od powszechnie opisywanej techniki spryskiwania pasków bibuły przy pomocy rozpylacza. Z użyciem rozpylacza łączy się kilka niedogodności: krople padające na pasek bibuły często posiadają różne rozmiary, co powoduje nierównomierne nasycenie odczynnikiem wywołującym wszystkich części powierzchni bibuły; odczynnik rozpryskuje się poza pasek bibuły i powoduje niszczenie otaczających lub sąsiadujących sprzętów; zużycie odczynnika do wywoływania jest znaczne.

Z tych względów zastosowaliśmy sposób przypominający wywoływanie błon fotograficznych, a mianowicie zanurzanie pasków bibuły w dużym płaskim naczyniu (płytce Petriego), zawierającym niewielką ilość odczynnika wystarczającą do równomiernego zwilżenia całej powierzchni paska bibuły.

W dalszym ciągu pracy przeprowadzaliśmy próby rozdzielania niektórych cukrowców redukujących zarówno przy pomocy chromatografii jedno- jak i dwu-kierunkowej. Trudności techniczne przy chromatografii dwukierunkowej w zastosowaniu do tego typu zagadnień jak konieczność przedłużania czasu spływu fazy ruchomej i związana z tym konieczność przedłużania pasków bibuły ponad normalną ich długość, a następnie nieekonomiczne zużywanie dużych ilości cennej dla nas bibuły — wszystko to skłaniało nas do zwrócenia uwagi na możliwości rozdzielania interesujących nas cukrowców na jednokierunkowych chromatogramach przez zastosowanie rozmaitych układów rozpuszczalników. Jako wstępny materiał wykorzystaliśmy tu dane zawarte w pracach Partridge'a oraz w pracy Jermyna i Insherwooda (11) odnoszące się do trójskładników układów rozpuszczalników. Obu ostatnim autorom udało się rozdzielić na jednokierunkowym chromatogramie arabinozę, ksylozę, glukozę, kwas galakturonowy i galaktozę przy pomocy układów złożonych z octanu etylowego, pirydyny i wody lub kwasu octowego, octanu etylowego i wody.

Badania nad wpływem stężenia badanych cukrowców na ich współczynnik podziału (R_F) przeprowadzano na roztworach w granicach stężeń 0,1% do 10% przy użyciu stale tej samej mikropipetki, której krople posiadały objętość 6—8 mikrolitrów.

W naszych doświadczeniach nie stosowaliśmy oczyszczania bibuły chromatograficznej od zanieczyszczeń solami nieorganicznymi, a zwłaszcza solami ciężkich metali, jednakże na podstawie otrzymanych wyników przypuszczamy, że w przypadku badanych przez nas węglowodanów zanieczyszczenia te nie wpływają w widoczny sposób na współczynniki podziału.

Wyniki doświadczeń zgromadzone w załączonych tabelach opracowaliśmy metodą analizy statystycznej.

Dyskusja

Nasze doświadczenia miały na celu zbadanie wpływu warunków doświadczalnych na wartości R_F poszczególnych cukrowców oraz opracowanie najlepszych warunków dla rozdzielenia węglowodanów

Tabela I.
Wpływ wymiarów kamery chromatograficznej.

Arabinoza				Ksyloza			
Kamera I		Kamera II		Kamera I		Kamera II	
R_F	f	R_F	f	R_F	f	R_F	f
0,57	1	0,53	1	0.46	3	0,41	2
0,56	1	0,52	1	0,45	4	0,40	1
0,55	1	0.51	1	0,44	2	0,39	2
0,54	4	0,50	1	0,43	2	0,38	1
0.53	5	0,49	3	—	—	—	—
0,52	1	—	—	—	—	—	—
0.51	1	—	—	—	—	—	—
$\bar{x} = 0{,}54$		$\bar{x} = 0{,}50$		$\bar{x} = 0{,}45$		$\bar{x} = 0{,}40$	
$S_x = 0.15$		$S_x = 0.02$		$S_x = 0{,}01$		$S_x = 0{,}01$	
0,53 n 0.55		0,48 n 0,52		0,44 n 0,45		0,39, n 0,44	

Objaśnienie znaków: f = liczebność oznaczeń
$\bar{x}$ = średnia rzeczywista
S_x = odchylenie standartowe
n = przedział ufności (95% prawdopodobieństwa).

Warunki doświadczalne:

Układ rozpuszczalników: fenol-woda
Stężenie roztworu: 1%
Czas spływu: 11—14 godz.
Gatunek bibuły: Angel Genuine Nr 201
Wielkość kropli: 6—8 mikrolitrów
Szybkość spływu: 1,29 do 1,35 cm/godz.

Tabela I. (ciąg dalszy)

Wpływ wymiarów kamery chromatograficznej.

Fruktoza				Mannoza	
Kamera I		Kamera II		Kamera I	
R_F	f	R_F	f	R_F	f
0,58	1	0,53	1	0,46	1
0,57	2	0,52	1	0,45	3
0,56	5	0,51	2	0,44	3
0,55	4	0,50	2	0,43	1
0,54	7	0,49	2	0,42	1
0,53	3	0,48	1		
0,52	3				
0,51	3				
$\bar{x} = 0,54$		$\bar{x} = 0,50$		$\bar{x} = 0,44$	
$S_F = 0,02$		$S_x = 0,02$		$S_x = 0,01$	
0,54 u 0,55		0,49 u 0,51		0,44 u 0,45	

z mieszanin i hydrolizatów. Dalszym celem pracy było ustalenie, czy wyniki otrzymane przez innych badaczy i w odmiennych warunkach mogą być reprodukowane z dostateczną dokładnością w naszym zespole różnych warunków.

Ze względu na zaprojektowane badania nad mechanizmem przemiany dwucukrowców w rosnących komórkach Escherichia coli, postanowiliśmy przede wszystkim dokonać próby rozdzielania laktozy od monoz, jak też galaktozy od glukozy.

Pierwsze nasze doświadczenia przeprowadziliśmy w warunkach bardzo prymitywnych. Zamiast kamery służył nam słój (kamera II) mieszczący jeden i to krótki pasek bibuły. Dopiero w dalszych doświadczeniach zastosowaliśmy do badań duży termostat z płaszczem wodnym dobrze nadający się do doświadczeń w różnych zakresach temperatur. Porównując wyniki doświadczeń wykonywanych w obu kamerach stwierdziliśmy (patrz Tab. I), że wartości R_F na chromatogramach z kamery I były wyższe. Różnica ta, dochodząca do 0,04, pochodzi z nierównomiernego nasycenia parami rozpuszczalnika atmosfery obu kamer, a to wskutek znacznej różnicy ich objętości. Należy

podkreślić, że popełnialiśmy błąd polegający na tym, że nie nasycaliśmy pasków bibuły parami fazy wodnej w kamerze przed rozpoczęciem spływu fazy ruchomej. Stąd w początkowej fazie spływu istniał inny stopień nasycenia bibuły wodą niż w dalszych fazach spływu. Niemniej jednak uzyskiwane wartości R_F nie odbiegały na ogół od wartości podanych przez Partridge'a dla układu: fenol, cjanowodór, amoniak i woda bardziej niż mogliśmy się tego spodziewać.

Jednym z podstawowych warunków otrzymywania prawidłowych chromatogramów jest odpowiednia bibuła filtracyjna. Bardzo pożądanym byłoby wyprodukowanie w kraju bibuły dla celów chromatograficznych o charakterystyce zbliżonej do powszechnie używanej bibuły Whatmana Nr 1 lub Nr 4, tylko bowiem w ten sposób można będzie porównywać własne wyniki z danymi ogłaszanymi w literaturze naukowej. Dla ilustracji tego problemu zamieszczamy poniżej tabelkę przedstawiającą wartości R_F niektórych węglowodanów uzyskane na dwóch gatunkach bibuły (obu nadających się w zasadzie dla celów chromatografii) (p. Tab. II).

Tabela II.

G l u k o z a

Kamera I				Kamera II	
Whatman 1		Angel 201		Angel 201	
R_F	f	R_F	f	R_F	f
0,39	2	0,40	2	0,36	3
0,38	0	0,39	4	0,35	9
0.37	2	0,38	14	0,34	6
0,36	3	0,37	8	0.33	4
0,35	5	0,36	7	0,32	4
0,34	2	0,35	6	0:31	5
0,33	1	0,34	2	0,30	4
		0,33	2	0,29	1
		0,32	2		
$\bar{x}$ = 0,36		$\bar{x}$=0,37		$\bar{x}$ = 0,35	
S_x = 0,02		S_x = 0,02		S_x = 0,01	
0.35 n 0,37		0,36 n 0,37		0,32 n 0,34	

G a l a k t o z a

Kamera I				Kamera II	
Whatman 1		Angel 201		Angel 201	
R_F	f	R_F	f	R_F	f
0,43	1	0,45	1	0.38	2
0,42	1	0,44	3	0.37	1
0,41	1	0,43	3	0,36	4
0,40	0	0,42	2	0,35	4
0,39	3	0,41	3	0,34	1
0.38	3	0,40	2		
0,37	2	0,39	1		
0,36	3				
0,35	1				
$\bar{x}$ = 0,38		$\bar{x}$=0,42		$\bar{x}$ = 0,36	
S_x = 0,02		S_x = 0,02		S_x = 0,01	
0,37 n 0,40		0,41 n 0,43		0,35 n 0,37	

W a r u n k i d o ś w i a d c z a l n e: jak w Tab. I.

Wyniki doświadczeń nad wpływem stężenia cukrowców na ich współczynnik podziału podaje niżej zamieszczone zestawienie:

	Stężenie roztworu cukrowca w % (waga/obj.)						
	0,1	0,25	0,5	1	2	5	10
R_F glukozy	0,35	0,34	0.33	0,34	0,37	0,37	0,37
R_F fruktozy	0.56	0,54	0,53	0,54	0.53	0.56	0,54

Wynika stąd, że nawet znaczne różnice w stężeniach badanych roztworów nie wywierają większego wpływu na wartości współczynnika R_F. Odchylenia nie przekraczają granic zwykłego błędu doświadczalnego.

W celu wykazania istnienia wpływu temperatury na wartość współczynnika podziału wykonaliśmy doświadczenia porównawcze w temperaturach 20° i 40°C przy zachowaniu niezmienionych innych warunków doświadczalnych.

	Temperatura atmosfery kamery	
	20°	40°
R_F glukozy	0,33	0,39
R_F fruktozy	0,49	0,52

Stosunkowo niewielkie wahania wartości współczynnika podziału przy znacznej różnicy temperatur potwierdzają nasze przypuszczenia, że odnośnie węglowodanów normalne wahania temperatury pokojowej w granicach 1°—5°C nie mają praktycznie znaczenia.

Zmiany temperatury nawet w niewielkich rozpiętościach (3°—5°) wpływają silnie na szybkość spływu frontu rozpuszczalnika po pasku bibuły. Znaczna zgodność wyników doświadczalnych uzyskana przy różnych temperaturach była dla nas niespodziewana, ponieważ jest znaną rzeczą, że współczynniki podziału są bardzo czułe na zmianę temperatur. Ta zgodność, jak sądzimy, może być wynikiem pewnej wzajemnej kompensacji wpływu temperatury na wartość R_F z jednej strony, a z drugiej strony na przyśpieszenie lub zwolnienie spływu frontu fazy ruchomej układu rozpuszczalników.

Zestawienia w Tab. III i IV wskazują na wpływ związków towarzyszących na wartości R_F. Uwzględniliśmy przede wszystkim sole, kwasy i zasady, ponieważ te związki występują w hydrolizatach ba-

Tabela III.

Wpływ soli towarzyszących na wartości R_F.

Węglowodan	Związek dodany	Zakres R_F węglowodanu	Ilość doświadczeń	Średnia wartość R_F
Glukoza 2% (roztw. wodny)	NaCl 4%	0,37	4	0,37
"	$BaCl_2$ 2%	0,38 — 0,37	2	0,37
"	Na_2SO_4 5%	0,38 — 0,33	6	0,35
"	Na_2SO_3 5%	0,38 — 0,32	4	0,34
"	CH_3COOH 5%	0,38 — 0,29	5	0,32
"	—	0,37	2	0,37

Warunki doświadczalne: jak w Tab. I.

Tabela IV.

Wpływ towarzyszących kwasów i zasad na wartości R_F.

Węglowodan	Związek dodany	Zakres R_F węglowodanu	Ilość doświadczeń	Średnia wartość R_F
Glukoza 1%	HCl 1 N	0,37	1	0,37
"	H_2SO_4 1 N	0,36 — 0,35	2	0,35
"	CH_3COOH 1 N	0,36	1	0,36
"	NaOH 1 N	0.39 — 0.35	2	0,37
"	NH_4OH 1 N	0,37	1	0,37
"	—	0,39 — 0,38	2	0.38
Galaktoza 1%	HCl 1 N	0,40	1	0,40
"	H_2SO_4 1 N	0,41	1	0,41
"	CH_3COOH 1 N	0,45	1	0,45
"	NaOH 1 N	0,45	1	0,45
"	NH_4OH 1 N	0,44	1	0,44
"	—	0,42	1	0,42
Fruktoza 1%	H_2SO_4 1 N	0,53	1	0,53
"	NaOH 1 N	0,56	1	0,56
"	—	0,54	1	0,54

Warunki doświadczalne: jak w Tab. I.

danych materiałów biologicznych. Wpływ soli towarzyszących w stężeniach do 5% na współczynniki podziału cukrowców jest nieznaczny. Ze sprawą występowania soli, jako zanieczyszczeń w badanych roztworach wiąże się ta niepomyślna okoliczność, że przy użyciu odczynnika Tollensa jako odczynnika wywołującego powstają na bibule dodatkowe plamy, które mogą niekiedy utrudniać prawidłowe obliczenia współczynnika R_F. Późniejsze nasze doświadczenia, w których zastosowaliśmy odczynnik benzydynowy zamiast amoniakalnego roztworu azotanu srebra, pozwoliły nam całkowicie uniezależnić się od obecności soli znajdujących się w badanych roztworach. Kwasy i zasady nie mają widocznego wpływu na R_F nawet w stężeniach 1 N. O braku wpływu wymienionych wyżej zanieczyszczeń bibuły solami metali oraz związków towarzyszących w badanych roztworach węglowodanowych na wartości ich współczynników podziału może świadczyć również fakt, że istnieje duża zgodność wyników podanych w literaturze (gdzie autorzy stosowali cjanowodór i amoniak w celu zniweczenia wpływu

Tabela V.

Rozdzielanie pentoz.

Pentoza	Kamera I						Kamera II		
	Whatman 1	y	d	Angel 201	y	d	Angel 201	y	d
Arabinoza 1%	R_F 0,56	20	1,9	R_F 0,53	17,4	1,5	R_F 0,52	0,52	1,8
Ksyloza 1%	R_F 0,47			R_F 0,46			R_F 0,40	0'40	

Warunki doświadczalne: jak w Tab. I.

Objaśnienia:

y = odległość frontu fazy ruchomej (po ukończeniu doświadczenia) od miejsca wkroplenia badanego roztworu w cm.

d = wzajemna odległość pomiędzy środkami plam dwóch rozdzielanych cukrowców w cm. Wielkość tę można obliczyć na podstawie wzoru:

$d = y\ (R_{F1} - R_{F2})$, gdzie R_{F1} oznacza cukrowiec o większym R_F.

Jeżeli np. dla oddzielenia dwóch plam wymagane jest d = 2 cm, to z powyższego wzoru można obliczyć wartość y konieczną dla uzyskania całkowitego rozdzielenia, a tym samym można obliczyć jaką długość winien posiadać pasek bibuły.

Tabela VI.

Rozdzielanie heksoz.

A. Mieszanina glukozy i fruktozy.

Rodzaj kamery i bibuły	R_F glukozy	R_F fruktozy	y	d
Kamera I. Whatman 1.	0,38	0,60	29,2	6,42
"	0,39	0,59	26,1	5,22
"	0,40	0,59	25,4	4,82
średnio	0,39	0,59	26,9	5,5
Angel 201	0,43	0,55	14,5	1,74
"	0,38	0,55	15,5	2,63
"	0,38	0,51	16,0	2,08
"	0,38	0,56	16,5	2,97
"	0,37	0,54	16,5	2,80
"	0,36	0,54	16,5	2,97
"	0,36	0,54	15,7	2,83
"	0,36	0,55	16,0	3,04
średnio	0,37	0,54	15,9	2,70
Kamera II. Angel 201	0,33	0,52	15,2	2,89
"	0,31	0,50	16,2	3,08
średnio	0,32	0,51	15,7	2,98

B. Mieszanina glukozy i galaktozy

Rodzaj kamery i bibuły	R_F glukozy	R_F galaktozy	y	d
Kamera I. Whatman 1.	0,48	0,52	73,4	2,94
"	0,47	0,52	73,4	3,67
"	0,39	0,44	38,3	1,92
"	0,38	0,43	29,2	1,46
"	0,37	0,37	19,0	0
"	0,37	0,37	19,0	0
"	0,36	0,36	18,8	0
średnio:	0,40	0,43	—	—
Angel 201	0,37	0,44	16,3	1,14
"	0,32	0,40	16,1	1,29
średnio:	0,34	0,42	16,2	1,21
Kamera II. Angel 201	0,38	0,39	14,0	0
"	0,36	0,37	14,9	0
"	0,35	0,35	14,5	0
średnio:	0,36	0,37	14,5	0

Tabela VI. (ciąg dalszy)

C. Mieszanina glukozy i mannozy.

	R_F glukozy	R_F mannozy	y	d
Kamera I. Whatman 1.	0,39	0,45	16,3	0,98
Angel 201.	0,36	0,44	14,4	1,15
Kamera II. Angel 201.	0,33	0,41	16,3	1,30

D. Mieszanina fruktozy i mannozy.

	R_F fruktozy	R_F mannozy	y	d
Kamera I. Whatman 1.	0,62	0,50	29,2	3,50
Angel 201.	0,54	0,44	16,5	1,65

Warunki doświadczalne: jak w Tab. I.

Tabela VII.

Rozdzielanie dwucukrowców.
(Wyłącznie w kamerze I).

Laktoza				Maltoza	
Whatman 1.		Angel 201.		Angel 201.	
R_F	f	R_F	f	R_F	f
0,33	1	0,33	2	0,36	2
0,32	0	0,32	4	0,35	2
0,31	1	0,31	3	0,34	4
0,30	4	0,30	2	0,33	1
0,29	3	0,29	0	0,32	2
0,28	1			3,31	3
0,27	1			0,30	1
$\bar{x} = 0,30$		$\bar{x} = 0,32$		$\bar{x} = 0,33$	
$S_x = 0,02$		$S_x = 0,03$		$S_x = 0,02$	
0,29 n 0,31		0,29 n 0,34		0,32 n 0,35	

Warunki doświadczalne: jak w Tab. I.

Tabela VIII.

Rozdzielanie mieszanin laktozy, glukozy i galaktozy.
(Próby zastosowania różnych układów rozpuszczalników).

Skład objętościowy układu rozpuszczalników	y	R_F laktozy	d_1	R_F glukozy	d_2	R_F galaktozy
$F_1 : W_2$	38,3	0,35	1,5	0,39	1,9	0,44 *
„ „	73,4	0,43	3,6	0,48	2,9	0,52
„ „	73,4	0,43	2,9	0,47	3,7	0,52
$F_{15} : K_2 : W_{15}$	35,5	0,48	0,9	0,45	2,4	0,53
$F_{15} : K_1 : W_{16}$	30,7	—	—	0,37	2,5	0,45
$F_{15} : K_2 : W_{16}$	15,1	0,02	0,6	0,06	0,3	0,08
$F_{20} : A_1 : W_{20}$	14,7	0,25	0,6	0,29	0,4	0,32
$F_{15} : A_1 : W_{15}$	14,9	0,18	1,0	0,25	0,6	0,29
$F_{10} : A_1 : W_{10}$	7,6	0,15	0,4	0,20	0,4	0,25
$F_{10} : A_1 : W_{50}$	11,5	0,13	0,7	0,19	0,5	0,23
$F_7 : A_1 : W_7$	32,5	0,12	2,3	0,19	0,7	0,21
$F_7 : A_1 : W_7$	12,3	0,11	0,6	6,16	0,7	0,29
$F_7 : A_1 : W_7$	15,7	0,14	1,3	0,22	0,5	0,25
$F_7 : A_1 : W_7$	37,1	0,11	1,0	0,17	1,1	0,20
$F_5 : A_1 : W_5$	12,5	0,09	0,8	0,15	0,6	0,20
$F_3 : A_1 : W_9$	16,3	0,07	1,0	0,08	0,2	0,09
$F_3 : A_1 : W_9$	15,0	0,01	0,9	0,07	0,0	0,07
$F_3 : A_1 : W_{16}$	15,1	0,02	0,6	0,06	0,3	0,08
$F_3 : A_1 : W_{15}$	15,4	0,02	0,2	0,06	0,3	0,07
$F_{40} : K_{10} : W_{50}$	45,7	0,19	2,1	0,17	4,4	0,08
$F_{30} : K_3 : A_1 : W_{30}$	31,5	—	—	0,49	0,6	0,51

Warunki doświadczalne: jak w Tab. I.

Objaśnienia: F = fenol, W = woda, K = kwas octowy lodowaty, A = alkohol izoamylowy, B = n-butanol.
Liczby postawione przy literach oznaczają stosunki objętościowe poszczególnych składników mieszaniny.
d_1 = odległość między środkami plamy laktozy i glukozy w cm.
d_2 = „ „ „ „ glukozy i galaktozy w cm.

(Uwaga: w tabeli tej wartości „d" obliczano bezpośrednio na chromatogramach, a nie z przytoczonego poprzednio wzoru).

* rożne wartości R_F dla tego samego związku w tym samym układzie przy różnych czasach spływu należy odnieść do różnych warunków nasycenia kamery parami rozpuszczalników.

zanieczyszczeń ciężkimi metalami i kwasami) z naszymi wynikami, pomimo niestosowania przez nas środków oczyszczających bibułę lub usuwających sole z roztworów. Zgodność ta dotyczy, oczywiście, doświadczeń z identycznymi układami rozpuszczalników.

W następnych doświadczeniach podjęliśmy próby rozdzielania cukrowców w ich mieszaninach (p. Tab. VI). Na ogół, współczynniki R_F oznaczone dla czystych cukrowców nie różniły się od oznaczonych dla tychże cukrowców występujących w mieszaninie. W naszych warunkach doświadczalnych uzyskaliśmy rozdzielenie się arabinozy i ksylozy, glukozy i fruktozy.

Wprowadziliśmy wskaźniki „y" i „d", które pozwalają nam przewidywać, jakiej długości powinny być paski bibuły, aby rozdzielenie cukrowców doszło do skutku. Z naszej praktyki doświadczalnej wy-

Tabela IX.

Rozdzielanie hydrolizatów sacharozy i rafinozy.

Hydrolizat sacharozy

	y	R_F	d	
glukoza	15,7	0,36	2,8	
fruktoza		0,54		
glukoza	16.0	0,38	2,1	$\bar{x}$ glukozy = 0,37
fruktoza		0,51		$\bar{x}$ fruktozy = 0,53
glukoza	15,5	0.38	2,6	
fruktoza		0,55		

Hydrolizat rafinozy

y	R_F glukozy	l_1	R_F galaktozy	d_2	R_F fruktozy
15.7	0,32	1,0	0,38	1,7	0,50
14,5	0,35	1.1	0.42	1,8	0,55
15,7	0.32	1,0	0,38	1.7	0,50
	$\bar{x}$ = 0,33		$\bar{x}$ = 0.39		$\bar{x}$ = 0,5 2

Warunki doświadczalne: kamera I, bibuła Angel Nr 201, układ fenol - woda.

nika, że wartości „d", oznaczające odległości pomiędzy środkami dwóch plam muszą być większe od 3 cm, jeżeli plamy te nie zlewały się ze sobą.

W układzie fenol-woda wiele niepokonalnych trudności nastręczało rozdzielenie glukozy od galaktozy i laktozy. Zastosowanie szeregu kombinacji układów trójskładnikowych, w skład których wchodziły fenol, kwas octowy i woda lub fenol, alkohol izoamylowy i woda, a nawet jednego układu czteroskładnikowego z udziałem wszystkich tych wymienionych rozpuszczalników, oraz długich pasków bibuły pozwoliło nam ostatecznie osiągnąć pożądane rozdzielenie. Ponieważ używane przez nas paski bibuły posiadały tylko 54 cm długości, przeto zachodziła konieczność połączenia dwóch pasków odpowiedniej długości ze sobą. Stwierdziliśmy przy okazji, że najbardziej równomierny, niezakłócony spływ rozpuszczalnika otrzymuje się przy łączeniu pasków przy pomocy cienkiej nitki szklanej.

W końcowym etapie doświadczeń stwierdziliśmy, że w hydrolizatach oligosacharydów oraz kwasu nukleinowego drożdżowego identyfikowanie monoz nie natrafia na żadne trudności. Przeprowadzono także oznaczenie wartości R_F dla kwasu glukuronowego i glukozaminy.

Tabela X.

Oznaczenie wartości R_F glukozaminy, kwasu glukuronowego i rybozy (d-ryboza z hydrolizatu soli sodowej kwasu nukleinowego drożdżowego).

	kwas glukuronowy		glukozamina		d-ryboza	
	R_F	f	R_F	f	R_F	f
Kamera I. Whatman 1.	0.14	2				
„	0.15	1				
Angel 201.	0,11	1			0,62	2
„	0,12	1			0,63	1
„	0.13	1			0,64	1
„					0,69	1
	$\bar{x} = 0,13$				$\bar{x} = 0.64$	
Kamera II. Angel 201.			0,16	1		
„			0,17	2		
„			0,18	1		
			$\bar{x} = 0,17$			

Warunki doświadczalne: jak w Tab. I.

PIŚMIENNICTWO

1. R. Consden, A. H. Gordon i A. J. P. Martin — Biochem J., 38, 224, 1944.
2. L. C. Craig — J. Biol. Chem., 155, 519, 1944.
3. M. S. Cwiet — Trudy Warszawskogo obszczestwa jestestwoispytatelej, Otdieleni biołogii, 1903.
4. R. B. Fisher, D. S. Parsons i G. A. Morrison — Nature, 162, 180, 1948.
5. A. E. Flood, E. L. Hirst i J. K. N. Jones — Nature, 160, 86, 1947.
6. N. A. Fuks — Uspiechi Chimii, 17, 45, 1948.
7. T. B. Gapon — Uspiechi Chimii, 17, 452, 1948.
8. T. B. Gapon i E. H. Gapon — Dokłady Akademii Nauk ZSRR, 60, 401, 1948.
9. F. Goppelsröder — Über Kapillar-Analyse und ihre verschiedenen Anvendungen, sowie über das Emporsteigen der Farbstoffe in den Pflanzen. Wien 1889.
10. J. R. Hawthorne — Nature, 160, 714, 1947.
11. F. A. Isherwood i R. Hanes — Nature, 164, 1107, 1949.
12. M. A. Jermyn i F. A. Isherwood — Biochem. J., 44, 402, 1949
13. R. Kuhn, A. Winterstein i E. Lederer — Z. physiol. Chemie, 197, 141.
14. A. J. P. Martin i R. L. M. Synge — Biochem. J., 35, 1358, 1941.
15. A. J. P. Martin — Partition Chromatography. Biochem. Soc. Symp., Nr 3, 1949.
16. J. Opieńska-Blauth, M. Kański, i L. Stobińska — Annales U. M. C. S., Sectio D, Vol. IV, 4, 1949.
17. S. M. Partridge — Nature, 158, 270, 1946.
18. S. M. Partridge — Biochem. J., 42, 238, 1948.
19. W. W. Raczinskij — Uspiechi Chimii, Tom XIX, zesz. 4, 445, 1950.
20. F. Schönbein — Verhandlungen der Naturforsch. Ges. zu Basel von Jahre 1861, III Teil, I Heft.
21. M. M. Senjawin — Uspiechi Chimii, 18, 206, 1949.
22. A. A. Tananajew — Kapielnyj metod, Swierdłowsk—Moskwa, GONTI. 1939.
23. T. I. Williams — An Introduction to Chromatography, Blackie, 1947.
24. L. Zechmeister — Progress in Chromatography 1938—1947, Chapman, 1950.

РЕЗЮМЕ

1. Подано краткий курс теории и техники хроматографии фильтровальной бумаги.
2. Проведено опыты над влиянием некоторых факторов:
   степень насыщения камеры парами растворителей,
   сорт фильтровальной бумаги,
   температура внутри камеры,
   концентрация растворов испытуемых углеводов.
3. Установлено: что наилучшей фильтровальной, среди доступных, является бумага Whatman Nr 1 и Angel Reewe Nr 201.
4. Дискутировано над действием температуры и загрязнения фильтровальной бумаги солями, кислотами и щелочами.
5. Разработано систему растворителей в присутствии которой на длинных полосках фильтровальной бумаги можно отделить лактоз, глюкоз и галактоз.
6. Описано способ исчисления длины ленты фильтровальной бумаги чтобы получить полное разделение двух соединений, которых R_F сближено.

SUMMARY

1. A short outline of the historical developement of the partition chromatography, its theory and technique has been given.
2. There have been conducted experimental investigations on the influence of such factors as:
   saturation degree of the chromatographic chamber with solvent vapours, quality of the chromatographic paper,
   temperature of the interior part of the chamber,
   concentration of investigated carbohydrate solutions,
   composition of solvent system,
   kind and concetration of accompayning substance in sugar hydrolysates, on R_F values of the investigated carbohydrates.
   lysates, on R_F values of the investigated carbohydrates.
3. From different attainable filter paper the Whatman's paper Nr 1 and Angel Reeve Nr 201 have been proved to be suitable for chromatographic puposes.
4. The influence of temperature as well as of impurities of the paper or salts, acid and alkali solutions on the R_F has been discussed.
5. It has been elaborated a system of solvents with which one could obtain a successfui separation of lactose, glucose and galactose on long strips of paper.
6. There has been described a means of calculating the lengths of filter for complete separation of two compounds of closely related R_F values.

Papier druk. sat. III kl. 90 g. Format 70 x 100. Ark. druku 1³/₄.
Annales U.M.C.S. Lublin 1951. Lub. Druk. Prasowa Lublin, Kościuszki 4, Zam. nr 678, 6.IV.51, 1.500 egz.
A-2-13185. Data otrzymania manuskryptu 6.IV.51. Data ukończenia druku 2.X.51